

# LA MICROSCOPIE TOMOGRAPHIQUE DIFFRACTIVE : VERS UNE IMAGERIE QUANTITATIVE A HAUTE RESOLUTION ET A HAUTE VITESSE

Jonathan Bailleul, Bertrand Simon, Matthieu Debailleul, Olivier Haeberlé  
Laboratoire MIPS-EA2332 Université de Haute-Alsace, Mulhouse, France  
IUT de Mulhouse, 61 rue Albert Camus, 68093 Mulhouse Cédex

## RESUME

La microscopie de fluorescence est devenue la technique de référence en imagerie cellulaire, grâce à la spécificité des marquages, sa haute résolution, et la possibilité d'imager des spécimens vivants. Cependant, les fluorophores utilisés peuvent induire des effets indésirables, le marquage peut être difficile, et la vitesse d'acquisition est souvent limitée, surtout en imagerie tridimensionnelle.

Les techniques permettant l'observation des spécimens sans recourir à un marquage supplémentaire ont donc récemment connu un regain d'intérêt, comme par exemple la classique microscopie en transmission. Ces dernières années, de nombreux articles sont parus, présentant de nouvelles techniques d'imagerie combinant une reconstruction numérique des images des spécimens observés, basée sur un modèle de diffraction, avec de nouveaux systèmes d'acquisition, visant à acquérir les caractéristiques opto-géométriques des spécimens, sans préparation. Ces techniques sont connues sous différentes appellations : microscopie de phase, microscopie holographique numérique, microscopie à synthèse d'ouverture, microscopie tomographique en phase, microscopie tomographique diffractive. Elles offrent une meilleure précision, et/ou une meilleure résolution que les microscopes classiques, et/ou permettent de mesurer une information quantitative sur les propriétés optiques du spécimen observé. De plus, n'étant pas limitées par un faible flux lumineux, ces techniques permettent une imagerie ultrarapide (une image 3D en une seconde ou moins).

## 1. INTRODUCTION

Dans un microscope classique en transmission (**microscopie à fond clair**), l'image observée ne contient qu'une information morphologique de l'objet, et, en première approximation, l'intensité mesurée est liée à la densité optique du spécimen, car seule l'intensité de l'onde lumineuse traversant le spécimen est enregistrée.

Or, les phénomènes d'interaction lumière-matière intervenant dans le processus de formation des images en microscopie optique font en fait appel aux différentes caractéristiques de la lumière. La lumière étant une onde, sa phase peut être perturbée, sans que son amplitude le soit. Les détecteurs classiques étant sensibles à l'intensité uniquement (qui est la valeur moyenne de l'amplitude élevée au carré), on perd l'information de phase. Les phénomènes de diffraction à l'échelle microscopique se traduisent par des variations d'intensité (figure de diffraction), qui ne sont pas directement liées à des variations d'absorption, ce qui peut fausser l'interprétation des mesures à ces échelles. Enfin, la lumière d'illumination peut être polarisée ou non (imagerie polarimétrique), polychromatique ou monochromatique (imagerie hyperspectrale), collimatée ou convergente/divergente, éléments qui peuvent grandement modifier l'image obtenue du spécimen observé, et donc là encore, en fausser l'analyse, ou du moins la rendre plus délicate.

Ces dernières années, on a donc assisté à un regain d'intérêt pour des techniques permettant d'enregistrer **plus d'informations relatives à la lumière traversant le spécimen, et en particulier celles permettant d'enregistrer à la fois l'amplitude et la phase de l'onde traversant le spécimen. Celles-ci permettent en effet un accès à une** nouvelle grandeur physique : l'épaisseur optique, qui est le produit de l'épaisseur physique par l'indice optique du

spécimen. Cette mesure peut de plus se faire avec une très grande précision, et dans certains cas, on peut découpler l'épaisseur physique, ce qui donne alors accès aux indices optiques, qui apportent une information relative à la composition de l'échantillon analysé (voir Figure 5).

La microscopie tomographique diffractive [1-3] est une évolution de la microscopie de phase, combinant (comme expliqué sections 4.2 et 4.3) imagerie en amplitude et phase avec une variation des conditions d'observations, suivies d'une reconstruction numérique du spécimen observé (voir section 4). L'intérêt de cette approche, par rapport à la microscopie optique classique est double :

- l'information enregistrée est liée à la distribution 3D de l'indice optique dans le spécimen observé, une quantité difficilement, voire non accessible en microscopie optique classique [1,2].

- de plus, cette approche permet de doubler la résolution par rapport aux techniques de microscopie optique classique, ou de microscopie de phase déjà existantes [2-4].

Pour bien comprendre les principes de fonctionnement et l'intérêt de ces techniques, il est utile de rappeler les principes de bases des microscopes classiques en transmission les plus courants.

## 2. MICROSCOPIES CLASSIQUES EN TRANSMISSION

### 2.1. Microscope en transmission et illumination de Köhler

Le microscope en transmission est le plus courant. C'est le microscope d'initiation dans lequel tout le monde a regardé au moins une fois dans sa vie au lycée. Le principe en est très simple. Le spécimen est éclairé par transparence, à l'aide d'une source de lumière blanche. L'objectif capte la lumière transmise, et reforme une image, observée à l'œil à travers un oculaire, ou à l'aide d'une caméra vidéo. Ce microscope rend toujours d'immenses services par exemple pour les études en laboratoire d'analyses médicales.

Un problème spécifique du microscope en transmission est que la lumière n'est pas produite par le spécimen que l'on observe, mais par une source lumineuse, qui d'un point de vue optique, se situe sur le même axe que le spécimen. Une difficulté vient du fait que cette source est « proche » optiquement du spécimen. L'expérience peut alors conduire à l'observation simultanée de l'image du spécimen et d'une image, floue mais très brillante, de la source. La qualité des images obtenues est alors mauvaise, et l'information utile noyée dans un bruit de fond important.

Une élégante solution à ce problème a été proposée par August Köhler à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. L'idée est d'utiliser, au long de l'axe optique du microscope, des plans conjugués différents pour le spécimen et pour la lampe. On s'assure ainsi que les images de ces deux objets, transportées par le système optique, ne se confondent pas.

On utilise une lentille, qui collecte la lumière de la lampe (filament) et la focalise à l'entrée du condenseur. Ainsi, les rayons provenant de différents points de la source sont refocalisés sur un même point de l'objet à observer. Le microscope étant focalisé sur l'objet, on fait en sorte que différents points de la source correspondent à un même point de l'objet. Ceci est illustré par la Figure 1 en haut (rayons en rouge).

Simultanément, on s'arrange pour que les rayons issus d'un même point de la source soient focalisés parallèlement à travers le spécimen. On forme alors une image de la source dans le plan focal arrière de l'objectif, à un autre endroit que l'image de l'objet. Sur le capteur (rétine, pellicule, capteur CCD), la source n'est pas focalisée, et n'apparaît donc pas. Ceci est illustré par la Figure 1 en bas (rayons en bleus).

(Note : cette figure constitue un schéma de principe, et non un tracé de rayon optique rigoureux. On retiendra cependant que pour chaque rayon issu de l'objet, on peut trouver un rayon qui viendrait de la source d'illumination, et qui suit le même trajet optique.)

Ce principe de familles de plans conjugués séparés pour la source et le spécimen est essentiel pour obtenir de bonnes images. Ainsi, on peut obtenir une illumination uniforme du spécimen, même avec une source non-homogène, tel le filament d'une lampe. D'autre part, tout objet qui est focalisé dans un plan précis d'une famille de plans conjugués apparaîtra focalisé dans tous les autres plans de cette famille. Simultanément, on est sûr qu'il n'apparaîtra pas focalisé dans tous les plans de l'autre famille de plans conjugués.

Les plans où sont formées les images de l'objet, et qui doivent être conjugués, sont donc localisés successivement au niveau du diaphragme de champ, du spécimen lui-même, du diaphragme de l'oculaire, et du capteur, ici l'œil. Si l'on place un diaphragme à une quelconque de ces positions, on étend ou l'on restreint simplement le champ d'observation.

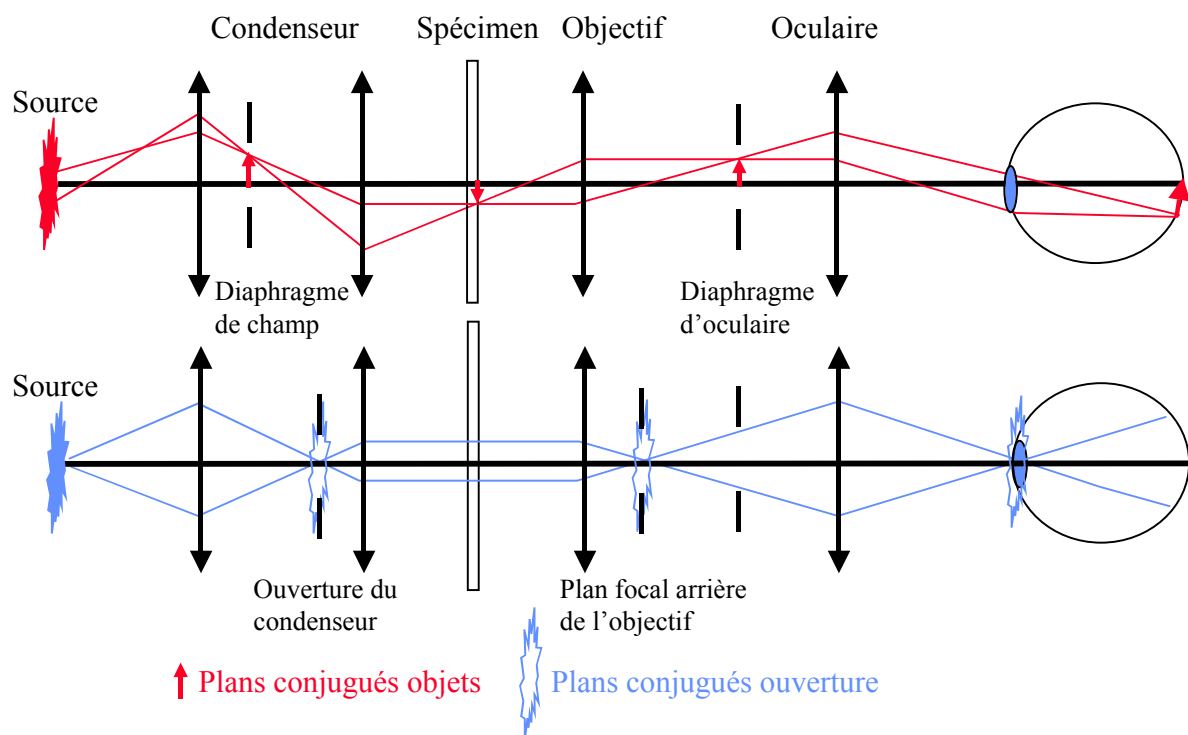


FIGURE 1. Principe du microscope en transmission en illumination de Koehler. En haut : trajet des rayons objets formant l'image, et de rayons provenant de points différents de la source, qui ont le même trajet optique après le spécimen. En bas : trajet de rayons issus d'un même point de la source, et formant un fond lumineux dans les plans objets.

Les plans correspondant à l'ouverture sont localisés au niveau de la source d'éclairage, du diaphragme d'ouverture du condenseur, du plan focal arrière de l'objectif, et de l'entrée du capteur (iris pour l'œil, objectif de caméra). Si l'on place un diaphragme à une quelconque de ces positions, on ouvre plus ou moins le cône de lumière d'illumination et/ou de détection du spécimen, ce qui permet de régler la luminosité (plus en moins de lumière est transmise à travers le système), le contraste des images (dans une certaine mesure, les rayons à différentes incidence n'interagissant pas de la même manière avec le spécimen), mais aussi la résolution, qui est liée à l'ouverture numérique globale du système (section 2.2) [5].

En particulier, le placement des filtres dans un microscope tire parti des plans conjugués. Tous les éléments susceptibles d'être contaminés par des poussières ou des taches (empreintes digitales) doivent être placés loin de tout plan conjugué du spécimen. Sinon, on formera sur l'image finale une image des défauts. Les filtres colorés, neutres, de polarisation sont soumis à cette règle impérieuse.

Inversement, si on désire superposer un réticule gradué à l'image finale pour pouvoir mesurer le spécimen, on le placera à l'emplacement d'un plan conjugué objet, souvent au niveau du diaphragme d'oculaire.

Dans ce montage, l'image est donc formée par les rayons de la source d'éclairage qui interagissent avec le spécimen. On observe donc en fait essentiellement des variations d'absorption, qui se traduisent par des variations de contraste ou des variations de couleur au niveau de l'image formée.

Lorsque le spécimen présente peu de contrastes, on peut effectuer une préparation, qui consiste à marquer certaines zones à l'aide de colorants spécifiques. On observe alors la forme ou la distribution de constituants précis du spécimen.

Le réglage adéquat de l'illumination de Köhler est une étape très importante pour l'obtention de bonnes images. La compréhension de ce mécanisme permet aussi d'envisager des modifications au principe de base du microscope optique.

## 2.2. Microscope en champ sombre

Lorsque le spécimen présente peu de contraste, et qu'on ne veut pas ou ne peut pas le colorer, il arrive alors que son image soit difficile à interpréter, car elle présente peu de variations. De plus, l'image est alors souvent noyée dans un fond clair uniforme (qui correspond à l'image non focalisée de la lampe source).

La compréhension du système d'illumination de Köhler permet alors de proposer une variante d'éclairage palliant ce problème, décrite par la Figure 2. L'idée consiste à éclairer le spécimen à l'aide uniquement de rayons ne pouvant être captés par l'objectif. **On utilise donc un condenseur avec une ouverture numérique plus grande que celle de l'objectif et l'on masque les rayons centraux (l'ouverture numérique d'un système optique (numerical aperture NA) est un nombre sans dimension le caractérisant. Pour un objectif, il vaut  $NA = n \sin \alpha$  où  $n$  est l'indice optique du milieu et  $\alpha$  l'angle de capture maximal des rayons par la lentille d'entrée de l'objectif. Plus un objectif est ouvert, plus il est lumineux, et meilleure est sa résolution. Pour un condenseur, la définition est la même, avec  $\alpha$  l'angle maximum des rayons émergeant du condenseur pour éclairer le spécimen. Plus l'ouverture numérique du condenseur est grande, meilleure sera la résolution. Dans un microscope en transmission classique, la résolution vaut en effet  $R = \lambda / (NA_{\text{objectif}} + NA_{\text{condenseur}})$ , ou  $R = \lambda / (2NA)$  quand on utilise un condenseur et un objectif de même ouverture numérique, comme dans la section 4).**

Les rayons d'illumination **à forte incidence** ne peuvent donc pas pénétrer l'objectif. Sans spécimen, on observe donc un champ uniformément noir (d'où le nom). Lorsqu'un spécimen est placé dans le champ, il va diffracter (au sens large du terme) une partie des rayons incidents. La lumière renvoyée par le spécimen peut alors être captée par l'objectif. On observe donc une image d'un spécimen lumineux sur un fond sombre.

Ce montage illustre bien un premier principe fondamental de l'imagerie à l'échelle microscopique : l'image n'est en fait pas formée par les rayons traversant le spécimen sans altération (ils ne peuvent en fait être captés par l'objectif dans cette configuration), mais bien par les rayons ayant interagit avec le spécimen, ici ceux qui ont été suffisamment réfractés ou diffractés pour être redirigés vers l'objectif.

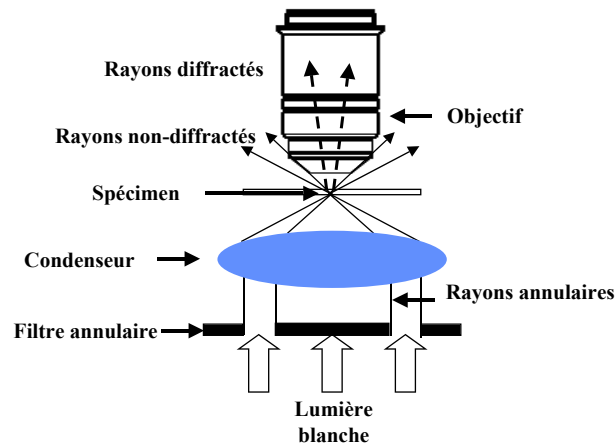


FIGURE 2. Principe du microscope en champ sombre

### 2.3. Microscope à contraste de phase

Certains spécimens n'absorbent pas ou que très peu la lumière, et la diffracte peu (spécimens de phase), et ils sont donc très difficilement observables en microscopie en transmission. Frits Zernike, physicien hollandais, a proposé dans les années 30 le microscope à contraste de phase pour résoudre ce problème.

La compréhension du microscope à contraste de phase fait appel à une interprétation légèrement différente du mécanisme de formation des images. Un spécimen de phase altère le faisceau d'illumination en le diffractant. L'œil humain n'est pas sensible à des variations de phase. Il faut donc trouver un mécanisme permettant de transformer les variations de phases en variation d'intensité. Pour cela, la microscopie à contraste de phase s'inspire du mécanisme qui crée les couleurs en microscopie polarisée : les interférences. On interprète l'image formée en terme d'effet de diffraction

L'ordre de diffraction zéro est la partie du faisceau d'illumination qui traverse le spécimen tout en étant inaltéré par celui-ci.

Pour les spécimens biologiques, Zernike a déterminé que le faisceau diffracté était retardé par le spécimen d'environ  $1/4$  de longueur d'onde. L'idée est alors d'avancer l'ordre zéro de l'image d'un autre  $1/4$  de longueur d'onde. Ainsi, l'ordre zéro (faisceau incident) et le premier ordre de diffraction (partie de faisceau altéré par le spécimen) sont maintenant en opposition de phase, décalé d'une  $1/2$  longueur d'onde, et donc capable de produire des interférences destructives.

Cette méthode permet donc de transformer des différences de chemin optique en contrastes visibles à l'œil, d'où son nom. Une image observée apparaît comme sombre sur un fond plus clair, qui correspond à l'illumination de la source (sans spécimen, on observe un fond uniforme). Cette technique porte le nom de contraste de phase sombre **ou négatif**.

Similairement, on peut aussi retarder l'ordre zéro de  $1/4$  de longueur d'onde, de façon à créer des interférences constructives au niveau du détecteur. L'image apparaît alors comme plus brillante que le fond, d'où le nom de contraste de phase clair, ou positif. Cette technique est cependant moins couramment utilisée que la précédente.

La microscopie à contraste de phase qui permet de transformer un objet de phase en un objet d'amplitude est très intéressante en biologie car elle permet d'étudier des spécimens sans avoir à **les colorer**. Les progrès qu'elle a permis ont été tels que l'invention de la microscopie à contraste de phase a valu à Frits Zernike le prix Nobel de physique en 1953.

La Figure 3 décrit le principe d'un tel microscope. On le comprend en partant du principe de l'illumination de Köhler. Tout d'abord il faut identifier un plan dans lequel on va pouvoir insérer la lame de phase permettant de décaler le faisceau incident par rapport au faisceau

diffraité. L'endroit le plus approprié est le plan focal arrière de l'objectif, où l'on sait qu'on forme une image de la source (rayons bleus). Par contre l'ensemble des rayons diffractés (en rouge) traverse aussi ce plan. Pour affecter sélectivement les rayons de l'ordre zéro, on utilise donc un diaphragme annulaire pour la source, placé au niveau de l'ouverture du condenseur, qui est plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif. Il suffit alors de placer une lame de phase annulaire dans ce plan pour quelle soit automatiquement superposée à l'image du diaphragme du condenseur (à condition d'ajuster correctement les tailles respectives de ces deux composants en fonction de l'objectif utilisé) et ainsi déphaser les rayons sources sans déphaser les rayons diffractés.

La composante diffractée est souvent d'amplitude bien plus faible que la composante directe. De ce fait, la modulation observable sur l'image finale serait petite. Pour améliorer le contraste, la lame de phase dans sa partie déphasante (+1/4 de longueur d'onde en contraste sombre) est aussi absorbante. Ainsi l'amplitude des ondes directes et diffractées est similaire et le contraste optimal.

Enfin, à cause de la dispersion chromatique, la lame de phase ne produit une avance de  $\lambda/4$  que pour une longueur d'onde précise. On travaille donc souvent en lumière quasi-monochromatique en microscopie à contraste de phase en insérant un filtre **à bande passante étroite** devant le condenseur.

Ce microscope traduit un second principe fondamental de l'imagerie à l'échelle microscopique : les contrastes observés ne sont pas seulement induits par des phénomènes d'absorption, mais aussi par le phénomène d'interférence constructive ou destructive, qui traduit une différence de chemin optique, non mesurable par l'œil ou une caméra, en un contraste d'intensité, qui est lui directement enregistrable.

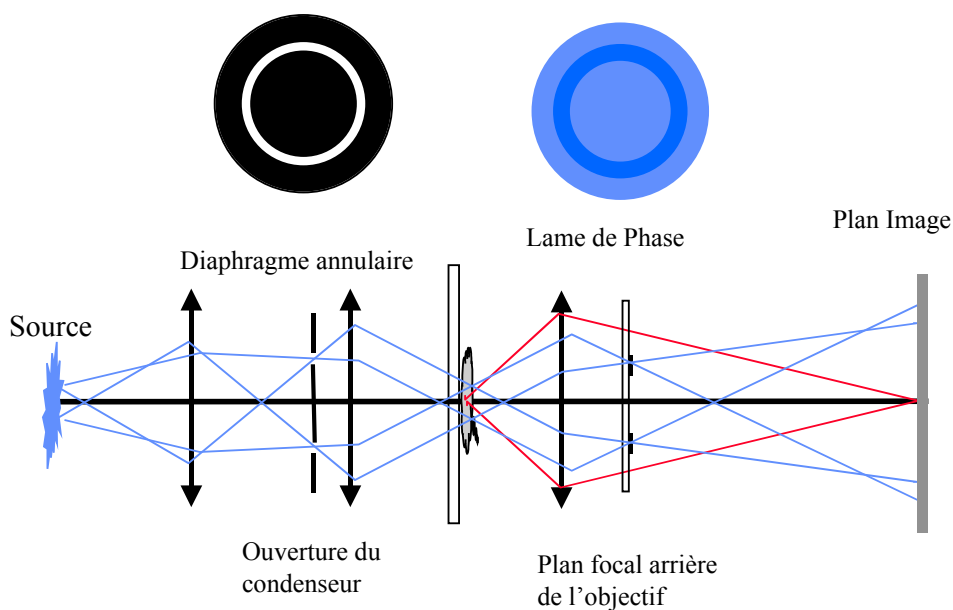


FIGURE 3. Principe du microscope à contraste de phase

Le lecteur intéressé par plus de détails sur ces trois variantes de microscopie optique (ainsi que de nombreuses autres) pourra en trouver sur le site <https://www.microscopyu.com> un descriptif approfondi, complété par des animations Java très didactiques. Ce site pourra constituer une très bonne introduction pour toute personne intéressée en particulier par les aspects instrumentaux des différentes techniques de microscopie optique. Plusieurs galeries d'images microscopiques en champ clair, champ sombre, contraste de phase positif et négatif, permettent aussi de mieux appréhender les contrastes fournis par ces techniques.



### 3. MICROSCOPIE AMPLITUDE-PHASE

En optique conventionnelle, lors de l'enregistrement d'une onde avec un capteur (plaque photographique, capteur CCD ou CMOS), seule l'intensité de cette onde peut-être mesurée, sa phase étant perdue. Or, cette phase est porteuse d'informations essentielles relatives à la traversée des spécimens observés, comme le prouve le fonctionnement du microscope à contraste de phase, mais aussi celui du microscope à contraste différentiel (DIC). Plusieurs techniques ont été développées pour enregistrer cette phase, les plus courantes étant basées sur l'holographie numérique (sections 3.1) ou sur l'utilisation d'analyseurs de front d'onde (section 3.2).

#### 3.1. Holographie numérique

L'holographie est historiquement la première technique qui a permis d'enregistrer une onde lumineuse à la fois en amplitude et en phase. Cette technique a été proposée par Gabor en 1948 [6], et consiste à utiliser une onde de référence, mélangée avec l'onde que l'on souhaite mesurer. Les deux ondes interfèrent et forment un hologramme, qui n'est donc rien d'autre qu'un enregistrement des franges d'interférences de ces deux ondes.

Cette technique a donc été aussi adaptée à la microscopie [7]. Elle a été utilisée entre autres avec succès pour l'étude d'écoulement de particules, la détonique, la vaporisation de fines gouttelettes (injecteurs de carburant). Ces phénomènes impliquent une observation dans un volume relativement grand (quelques mm<sup>3</sup> ou cm<sup>3</sup>), sont rapides, et peuvent nécessiter des protections spécifiques (détonique). La microholographie fournit une solution adaptée car elle peut être très rapide (utilisation de lasers pulsés, et/ou de caméras rapides), et l'étude de l'hologramme en tant qu'objet revient (presque) à étudier l'objet lui-même. Cependant, son usage est resté encore limité. La principale raison en est la relativement mauvaise résolution obtenue qui est adaptée aux cas décrits précédemment, mais limitant pour les études actuelles de pointe en biologie par exemple. Ceci est en train de changer avec le développement de microscopes dédiés à ces applications, vendus par des sociétés commerciales.

Un hologramme de l'objet observé est donc obtenu en utilisant une onde de référence interférant avec l'onde diffractée par cet objet. En considérant l'onde de référence R et l'onde diffractée par l'objet O, on obtient un champ final (R+O). L'intensité I<sub>H</sub> de l'hologramme enregistré vaut alors :

$$I_H(x,y)=(R+O)^* \cdot (R+O)=|R|^2 + |O|^2 + R^*O + O^*R$$

Les deux premiers termes sont appelés «ordre zéro». Ils sont constants ou varient très lentement dans l'espace, et sont indépendants de la phase relative de R et O. Les deux derniers termes sont le terme objet et le terme objet conjugué. Ils sont sensibles à la phase relative entre R et O, qui est la quantité utile en microscopie de phase. La reconstruction d'un front d'onde objet est alors obtenue en multipliant simplement I<sub>H</sub> par la référence R (connue) :

$$R \cdot I_H = R \cdot (R+O)^* (R+O) = R \cdot (|R|^2 + |O|^2) + |R|^2 O + R^2 O^*$$

La première partie correspond à l'ordre zéro, et doit être éliminée. La seconde partie correspond à l'image dite virtuelle avec laquelle on peut reconstruire numériquement l'objet par la propagation de R I<sub>H</sub> sur la distance d qui sépare l'hologramme de l'objet. Le dernier terme correspond à l'image dite réelle de l'objet, que l'on peut obtenir en propageant l'image dans la direction opposée sur la distance -d. Le terme O correspond à l'onde diffractée par l'objet. Après élimination de l'ordre zéro et de l'image réelle (par holographie à décalage de phase, ou par holographie dite hors-axe), l'onde diffractée par l'objet O est alors obtenue comme un champ complexe calculé dans le plan de l'hologramme.

A l'heure actuelle, tout ce processus d'acquisition et de reconstruction des hologrammes se fait de manière entièrement numérique, ce qui explique le succès de cette technique dans de nombreux domaines. Le lecteur intéressé par plus de détails trouvera une description très

complète de cette technique dans [8]. Pour les applications biologiques, **plusieurs compagnies proposent déjà des systèmes de microscopie holographique numérique** [9-11].

### 3.2. Analyseur de front d'onde

L'holographie a démontré son intérêt dans de nombreux **domaines**, mais la nécessité d'avoir une onde de référence complique les montages expérimentaux. Ces dernières années ont donc vu le développement de techniques permettant de s'affranchir de la présence de cette onde de référence.

L'idée est d'obtenir directement une carte de phase sur un capteur électronique, sans mélange avec une autre onde. En 1900, Hartmann a proposé de placer un masque troué (masque de Hartmann) sur le chemin de propagation de la lumière. Lorsqu'un front d'onde se propage, les déphasages locaux de ce front d'onde vont alors modifier l'image du motif. Le motif pour un front d'onde plan étant connu, il suffit de le comparer au motif obtenu après la propagation du front d'onde à analyser pour reconstruire une carte de phase. Cette technique appelée « analyseur de front d'onde » consiste donc à décomposer un front d'onde complexe en plusieurs fronts d'ondes élémentaires, puis à déterminer leurs orientations respectives. Ces orientations, appelées pentes locales, correspondent en fait à la mesure de la dérivée du front d'onde. Une intégration de cette mesure permet alors de reconstituer la forme du front d'onde. Plusieurs variantes ont été développées : analyseur de courbure, analyseur de Shack-Hartmann, interférométrie à décalage multilatéral. Cette dernière technique présente en particulier l'avantage de permettre un bon échantillonnage des spécimens observés [12], et un analyseur adapté pour les applications biologiques est maintenant aussi disponible [13].

## 4. APPORT DE LA TOMOGRAPHIE POUR L'IMAGERIE 3D

### 4.1 Limites de la microscopie de phase

Les techniques de microscopie de phase par holographie ou par analyseur de front d'onde présentent plusieurs avantages par rapport à la classique microscopie en intensité, ou par rapport à la microscopie de fluorescence.

Un premier avantage est la sensibilité. Les mesures de phase sont très précises, et peuvent facilement être rapportée à des changements de dimensions, mêmes infimes. Ainsi, des variations de quelques nanomètres d'épaisseur optique ont pu être mesurées sur des neurones lors de l'activation synaptique, et ces variations peuvent être corrélées aux courants neuronaux [14].

N'étant pas limité par de faibles niveaux de fluorescence, la microscopie de phase peut être très rapide. Par exemple, les modes de vibration des globules rouges ont pu être analysés en microscopie de phase, et reliés à des caractéristiques mécaniques de leur membrane [15]. Ces études **nécessitent** une imagerie à plusieurs dizaines, voire centaines d'acquisition par seconde.

Le lecteur intéressé trouvera dans [16-20] une revue des applications potentielles des techniques de microscopie de phase, et leurs dérivées.

Cependant, ces études en microscopie de phase peuvent être limitées par deux aspects :

- on ne peut mesurer que des variations de phase optique, qui sont une combinaison de l'épaisseur physique du spécimen observé et de son indice. Le découplage de ces deux données nécessite des hypothèses supplémentaires. Les images 3D ainsi obtenues sont en fait surfaciques, et correspondent à une projection des changements de phase observée lors la traversée du spécimen par la lumière.
- La résolution spatiale, mais surtout longitudinale reste limitée. En effet, les configurations considérées utilisent une seule incidence d'illumination, ce qui équivaut à utiliser un condenseur d'ouverture numérique nulle, ou très faible [21].



Pour ces raisons, l'imagerie holographique ou de phase de spécimens en transmission est souvent qualifiée d'imagerie 2,5D (surface 2D contenue dans un volume 3D).

La microscopie tomographique diffractive a été développée pour pallier ces limites. L'idée est de combiner la microscopie amplitude-phase, avec une variation des conditions d'illumination pour acquérir plus d'information sur le spécimen [2-3]. Ces informations sont alors recombinaées numériquement pour reconstruire une image 3D « vraie » de l'échantillon observé.

Cette technique repose sur la première approximation de Born [1], qui stipule que pour des objets faiblement diffractant (ce qui est bien adapté à la biologie cellulaire par exemple), le champ diffracté mesuré correspond à un sous-ensemble de la transformée de Fourier 3D de la distribution des indices optiques dans le spécimen. Deux approches ont été développées avec succès pour les applications biologiques : la microscopie tomographique diffractive par variation de la direction d'illumination, et la microscopie tomographique diffractive par rotation de l'échantillon.

#### 4.2. Tomographie par variation de l'illumination

Cette technique vise en fait à faire une synthèse numérique du condenseur d'Abbe, inutilisable en microscopie de phase classique. On fait donc varier l'angle d'incidence du faisceau d'illumination sur le spécimen [2-4]. Pour chaque incidence, un hologramme est enregistré. Le modèle de Born stipule qu'une transformée de Fourier 2D de cet hologramme correspond à une portion de calotte de sphère de la transformée de Fourier de la distribution des indices optiques dans le spécimen observé. Changer la direction d'illumination correspond à acquérir une autre calotte de sphère dans l'espace de Fourier.

Un grand nombre d'illumination permet de reconstituer le spécimen dans l'espace de Fourier, et une transformée de Fourier 3D finale permet alors de reconstruire deux images en partie réelle (indice du spécimen) et en partie imaginaire (correspondant à l'absorption dans le spécimen). Ce processus est illustré par la figure 4, qui montre aussi le prototype développé dans notre laboratoire.

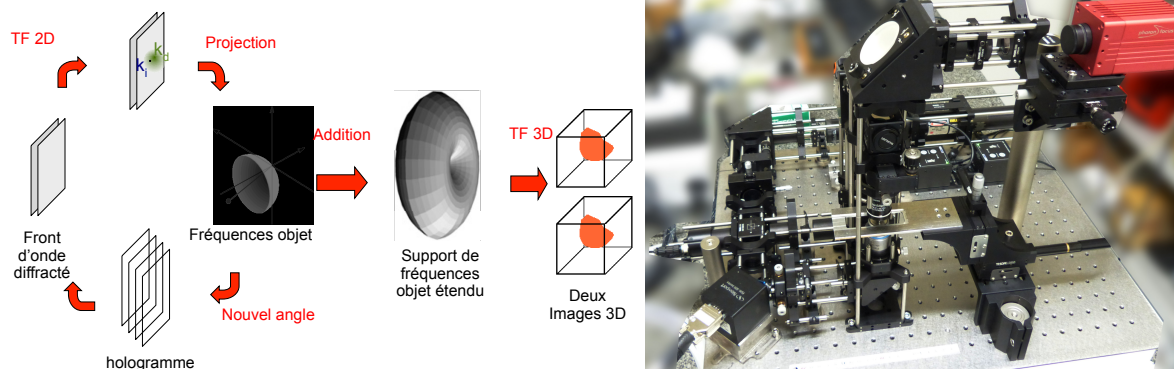


FIGURE 4. Principe du microscope tomographique diffractif et photographie du prototype développé au laboratoire MIPS

La figure 5 illustre la double imagerie permise par cet instrument, en absorption et en indice [1,2]. On notera la complémentarité des informations entre les deux images du même spécimen. Un microscope en transmission classique fournit une image qui est en fait un mélange de ces deux contributions. La mesure du champ électromagnétique diffracté permet alors de reconstruire les images qui seraient obtenues avec d'autres types de microscopes, par exemple l'image en champ clair (microscope en transmission), qui est simplement la somme des intensités enregistrées pour chaque hologramme intermédiaire, ou l'image en champ sombre, qui consiste à supprimer numériquement la composante continue (correspondant à l'illumination) de chaque hologramme. On pourrait ainsi aussi simuler un microscope en

contraste de phase ou en contraste de phase différentiel en 3D « vraie », en étendant les techniques déjà développées en microscopie holographique classique [22,23].

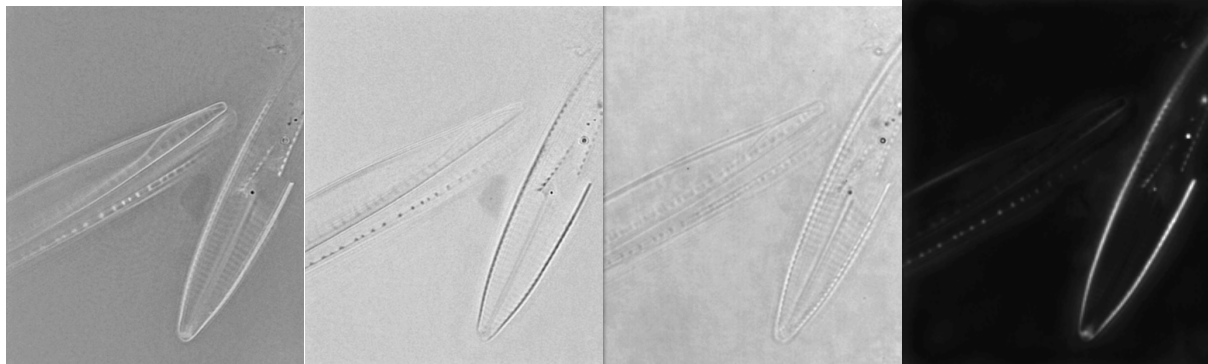


FIGURE 5. Reconstruction de diatomées observées en microscopie tomographique diffractive. De gauche à droite : indice, absorption, intensité reconstruite (correspondant à l'image d'un microscope classique en transmission), et intensité reconstruite sans l'illumination (correspondant à l'image d'un microscope en champ sombre et mettant en évidence les structures fortement diffractives).

Un autre avantage de cette approche est la très bonne résolution latérale permise par l'utilisation d'une imagerie en lumière cohérente (holographie) : en utilisant un laser Helium-Néon à 633 nm, une résolution latérale de 130 nm, soit  $\lambda/(3.5 \text{ NA})$  (contre  $\lambda/(2\text{NA})$  en microscopie classique) a été démontrée, meilleure que pour un microscope confocal utilisé dans les mêmes conditions [4,24]. Plus récemment et en utilisant une diode laser à 405 nm, une résolution latérale de 90 nm a été obtenue (soit  $\lambda/(3.2 \text{ NA})$ ) [25].

La résolution longitudinale est cependant moins bonne, et cet instrument **ne** possède pas les propriétés de sectionnement optique du microscope confocal [3,4,21,24]. Les images 3D ainsi obtenues présentent une résolution fortement anisotrope, ce qui peut limiter l'intérêt de cette approche. Ceci s'explique facilement en considérant le support des fréquences acquises (voir Figure 4) : il présente une large extension latérale (d'où la bonne résolution latérale), mais aussi un cône de fréquences manquantes le long de l'axe optique, ce qui limite la qualité de l'imagerie 3D selon cet axe. Des versions à haute vitesse de cette technique ont été développées, pour l'observation dynamique de spécimens vivants et sans marquage [25-30].

#### 4.3. Tomographie par rotation du spécimen

Pour obtenir une résolution isotrope, on peut procéder à une rotation du spécimen observé sur lui même, ce qui permet d'obtenir un support des fréquences objet enregistrées différent. La figure 6 compare les supports obtenus en tomographie diffractive par rotation de l'illumination, par rotation du spécimen, et en combinant les deux approches. La construction détaillée de ces supports est décrite dans [31,32].

La comparaison de la forme de ces supports permet de prédire les caractéristiques relatives des images obtenues avec ces trois techniques. La tomographie en rotation d'illumination (Fig. 6 gauche) permet donc une très bonne résolution latérale grâce à la grande extension du support le long des axes de fréquences  $(u,v)$  mais le cône de fréquences manquantes le long de l'axe  $w$  (correspondant à l'axe optique du système) limite le sectionnement optique.

La tomographie en rotation de spécimen (Fig. 6 milieu) permet une résolution quasi-isotrope (il subsiste des fréquences manquantes le long de l'axe de rotation du spécimen  $u$ ), mais l'extension du support est moins grande : la résolution finale est moins bonne que dans le cas précédent. De plus, cette technique nécessite un grand nombre de rotation du spécimen (typiquement une par degré). La rotation du spécimen peut être assurée via un support physique, mais diverses méthodes de rotation sans contact (pincettes optiques [33], champ électrique [34]) sont aussi en cours de développement. Plusieurs groupes développent cette approche de microscopie tomographique diffractive par rotation du spécimen [35,36].

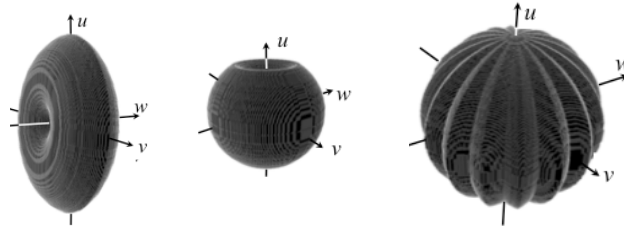


FIGURE 6. Supports de fréquences enregistrables en tomographie par rotation de l'illumination, rotation du spécimen, et combinaison des deux approches.

On peut alors penser à combiner les deux approches, pour obtenir une résolution élevée *et* isotrope, en combinant plusieurs acquisitions en tomographie par rotation d'illumination, avec une rotation du spécimen. La figure 6 droite détaille le support obtenu pour **8 acquisitions** du spécimen (**correspondants à 7 rotations successives de 22,5°**). Nous travaillons actuellement à développer cette dernière technique, qui serait bien adaptée à l'imagerie optique à haute résolution de spécimen libres, tels que des microcristaux, des fibres optiques, des pollens, des spores, des cellules sanguines, des diatomées...

La figure 7 montre les premiers résultats prometteurs obtenus sur une pointe de fibre optique amincie, en vue latérale (x-y), axiale (x-z), et en coupe (y-z). La figure 7 haut montre ces vues obtenues en microscopie tomographique diffractive par rotation d'illumination. On obtient une excellente résolution latérale sur la vue (x-y) (la pointe fait moins de 1  $\mu\text{m}$  de long), mais les images sont fortement déformées le long de l'axe optique z, à cause du problème du cône de fréquences manquantes le long de l'axe optique, visible sur la figure 6 (axe de fréquences w, correspondant à l'axe z dans l'espace image). Sur la vue axiale, la pointe de fibre n'est pas identifiable, et sur la coupe transversale, on constate que la section de la fibre reconstruite n'est pas circulaire.

La figure 7 bas montre une reconstruction en microscopie tomographique diffractive par rotation d'illumination combinant 5 vues différentes obtenues par rotation de la fibre : celle-ci est maintenant correctement reconstruite, et la résolution est isotrope, de l'ordre de **100 nm** (longueur d'onde d'observation **475 nm**,  $\text{NA}_{\text{objectif}} = \text{NA}_{\text{condenseur}} = 1,4$ ).

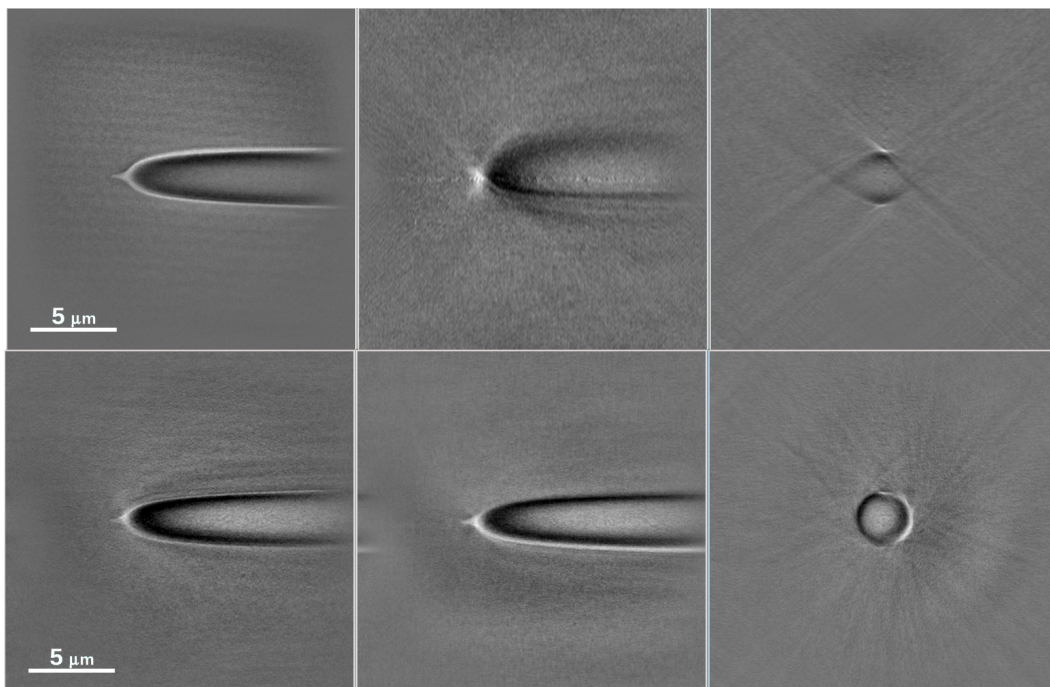


FIGURE 7. Pointe de fibre optique amincie observée en tomographie par rotation d'illumination uniquement (haut) et combinaison de rotation d'illumination et 5 rotations de la fibre (bas)

## 5. APPLICATIONS BIOLOGIQUES

La microscopie tomographique diffractive est une approche récente, même comparée à la microscopie holographique numérique. Néanmoins, certains résultats déjà obtenus laissent à penser que cette technique pourrait susciter l'intérêt des microscopistes désireux d'obtenir une imagerie 3D de haute résolution [4,21,24,25], rapide (1 image 3D par minute) voire ultra-rapide (une à plusieurs images 3D par secondes) [25-30], et quantitative (information liée à l'indice optique [25-30,35,36] mais aussi à l'absorption [4,21,24]).

L'imagerie 3D d'indice a été démontrée sur des spécimens artificiels, mais aussi naturels, permettant une observation intracellulaire à haute résolution, et permettant la différenciation des organites sans marquage, et le suivi de phénomènes cellulaires et intracellulaires.

L'imagerie tomographique diffractive rapide a permis d'observer sans marquage l'infection de globules rouges par le parasite de la malaria [27], des déplacements cellulaires [31,32], ou encore l'étude des mécanismes de division cellulaire [37].

La tomographie en lumière incohérente est basée sur la reconstruction d'une pile d'image 2D acquise en coupes sériées avec un analyseur de front d'onde [38]. Ceci a pour avantage de pouvoir se faire sur un microscope classique équipé d'une platine 3D et d'un analyseur de front d'onde. Enfin, une variante en lumière blanche a été développée, qui permet aussi de simplifier le montage optique, mais au prix d'une résolution plus limitée [39,40]. Cette technique est maintenant commercialisée [41].

## 6. CONCLUSION

La microscopie tomographique diffractive rapide permet l'acquisition des données nécessaires à la reconstruction de plusieurs images 3D par seconde, mais ces traitements sont actuellement effectués post-acquisition [26,30]. Au laboratoire MIPS, nous avons développé des méthodes de reconstruction numérique basées sur le calcul par GPU (Graphical Processor Unit) permettant à l'heure actuelle la reconstruction et la visualisation de 3,5 images 3D par seconde. La combinaison des deux approches, encore à réaliser, permettrait une imagerie 3D ultra-rapide de spécimens vivants non-marqués, avec une résolution latérale comparable voire meilleure qu'en microscopie confocale, et avec un affichage temps-réel des changements morphologiques dans le spécimen observé, ou des mouvements de celui-ci.

La combinaison de la tomographie en rotation d'illumination et en rotation de spécimen est plus limitée en termes d'échantillons observables, mais permet une résolution 3D isotrope, actuellement impossible en dehors de certaines techniques de fluorescence.

Ces méthodes devraient donc pouvoir intéresser à terme les biologistes désirant observer des spécimens non-marqués, avec une technique d'imagerie quantitative (indice/absorption dans le spécimen), et avec une très bonne résolution spatiale et temporelle. La technique de microscopie tomographique diffractive par rotation de l'illumination est elle aussi maintenant en phase de commercialisation [42].

Enfin, l'apport de techniques de mesures optiques apportant une information complémentaire à la phase (spectroscopie [43,44], polarimétrie [45]), devrait encore étendre les champs d'applications possibles de la microscopie tomographique diffractive à très haute résolution. Il faut noter que cette technique de tomographie optique s'applique aussi (avec certaines adaptations dans les algorithmes de reconstruction) à des spécimens beaucoup plus grands (la centaine de micromètres jusqu'au millimètre), tels que des embryons de poisson-zèbre et de souris, pour lesquels une résolution cellulaire est recherchée (et pas forcément subcellulaire), mais dans un volume d'investigation beaucoup plus étendu. De plus, cette approche reste compatible avec les techniques de fluorescence, et apporte alors une information morphologique complémentaire à l'information fonctionnelle délivrée en imagerie de fluorescence [45,46].



## REFERENCES

- [1] E. Wolf, *Three-dimensionnal structure determination of semi-transparent objects from holographic data*, Opt. Comm. **1**, p. 153 (1969)
- [2] V. Lauer, *New approach to optical diffraction tomography yielding a vector equation of diffraction tomography and a novel tomographic microscope*, J. Microscopy **205**, p. 165 (2002)
- [3] O. Haeberlé, K. Belkebir, H. Giovaninni and A. Sentenac, *Tomographic Diffractive Microscopy: Basics, Techniques and Perspectives*, J. Mod. Opt. **57**, p. 686 (2010)
- [4] M. Debailleul, *et al.*, *High resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples*, Opt. Lett. **34**, p. 79 (2009)
- [5] H.E. Keller, *Proper alignment of the microscope* Meth. Cell Biol. **56**, p. 135 (1998).
- [6] D. Gabor, *A New Microscopic Principle*, Nature **161**, p. 777 (1948)
- [7] E. Cuhe, P. Marquet, and C. Depeursinge, *Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms*, Appl. Opt. **38**, p. 6994 (1999)
- [8] Myung K. Kim, *Principles and techniques of digital holographic microscopy*, SPIE Reviews **1**, 018005-1 (2010)
- [9] <http://www.lynceetec.com>
- [10] <http://www.phiab.se>
- [11] <http://www.ovizio.com>
- [12] P. Bon, *et al.*, *Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells*, Opt. Expr. **17**, p. 13080 (2009)
- [13] <http://www.phasicscorp.com>
- [14] P. Jourdain, *et al.*, *Determination of Transmembrane Water Fluxes in Neurons Elicited by Glutamate Ionotropic Receptors and by the Co-transporters KCC2 and NKCC1: A Digital Holographic Microscopy Study*, J. Neurosci. **31**, p. 11846 (2011).
- [15] B. Rappaz, *et al.*, *Spatial analysis of erythrocyte membrane fluctuations by digital holographic microscopy*, Blood Cells Mol Dis. **42**, p. 228 (2009)
- [16] B. Kemper, *Digital holographic microscopy: quantitative phase imaging and applications in live cell analysis*, in Handbook of Coherent-Domain Optical Methods, V. V. Tuchin, ed. (Springer, 2013), pp. 215–257.
- [17] B. Bhaduri, *et al.*, *Diffraction phase microscopy: principles and applications in materials and life sciences*, Adv. Opt. and Phot. **6**, p. 57 (2014)
- [18] K. Lee, *et al.*, *Quantitative Phase Imaging Techniques for the Study of Cell Pathophysiology: From Principles to Applications*, Sensors **13**, p. 4170 (2013)
- [19] Myung K. Kim, *Digital Holographic Microscopy: Principles, Techniques, and Applications*, Springer Series in Optical Science Vol. 162, Springer, 2011
- [20] G. Popescu, *Quantitative Phase Imaging of Cells and Tissues*, McGraw Hill, 2011.
- [21] M. Debailleul, *et al.*, *Holographic microscopy and diffractive microtomography of transparent samples*, Meas. Sci. Technol. **19**, 074009 (2008)
- [22] J Lobera and J M Coupland, *Contrast enhancing techniques in digital holographic microscopy*, Meas. Sci. Technol. **19**, 025501 (2008)
- [23] L. Miccio, *et al.*, *Dynamic DIC by digital holography microscopy for enhancing phase-contrast visualization*, BioMed. Opt. Expr. **2**, p. 331 (2011)
- [24] B. Simon, *et al.*, *High resolution tomographic diffractive microscopy of biological samples*, J. Biophoton. **3**, p. 462 (2010)
- [25] Y. Cotte, *et al.*, *Marker-free phase nanoscopy*, Nature Phot. **7**, p. 113 (2013)
- [26] Choi W, *et al.*, *Tomographic phase microscopy*, Nature Meth. **4**, p. 717 (2007)
- [27] Y. Park, *et al.*, *Refractive index maps and membrane dynamics of human red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **105**, 3730 (2008)

- [28] Y. Sung, *et al.*, *Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging*, Opt. Expr. **17**, p. 266 (2009)
- [29] N. Lue, *et al.*, *Synthetic aperture tomographic phase microscopy for 3D imaging of live cells in translational motion*, Opt. Expr. **16**, p. 16240 (2008)
- [30] M. Kim, *et al.*, *High-speed synthetic aperture microscopy for live cell imaging*, Opt. Lett. **36**, p. 148 (2011)
- [31] S. Vertu, *et al.*, *Diffraction microtomography with sample rotation: influence of a missing apple core in the recorded frequency space*, Centr. Eur. J. of Phys. **7**, p. 22 (2009)
- [32] S. Vertu, *et al.*, *Improved and isotropic resolution in tomographic diffractive microscopy combining sample and illumination rotation*, Centr. Eur. J. of Phys. **9**, p. 969 (2011)
- [33] M. K. Kreysing, *et al.*, *The optical cell rotator*, Opt. Expr. **16**, p. 16984 (2008)
- [34] B. Le Saux, *et al.*, *Isotropic high-resolution three-dimensional confocal micro-rotation imaging for non-adherent living cells*, J. Microsc. **233**, p. 404 (2009)
- [35] A. Kus, *et al.*, *Tomographic phase microscopy of living three-dimensional cell cultures*, J. Biom. Opt **19**, 46009 (2014)
- [36] Yu-Chih Lin and Chau-Jern Cheng, *Sectional imaging of spatially refractive index distribution using coaxial rotation digital holographic microtomography*, J. Opt. **16**, 065401 (2014)
- [37] Y. Sung, *et al.*, *Size homeostasis in adherent cells studied by synthetic phase microscopy*, Proc Natl Acad Sci USA **110**, p.16687 (2013)
- [38] P. Bon, *et al.* *Enhanced 3D spatial resolution in quantitative phase microscopy using spatially incoherent illumination*, Opt. Expr. **22**, p. 8654 (2014)
- [39] B. Bhaduri, *et al.*, *Diffraction phase microscopy with white light*, Opt. Lett. **37**, p. 1094 (2012)
- [40] T. Kim, *et al.*, *White-light diffraction tomography of unlabelled live cells*, Nature Phot. **8**, p. 256 (2014)
- [41] <http://phioptics.com>
- [42] <http://nanolive.ch>
- [43] J. Jung, *Biomedical applications of holographic microspectroscopy*, Appl. Opt. **53**, G111 (2014)
- [44] A. Wax, *et al.*, *Optical Spectroscopy of Biological Cells*, Adv. Opt. and Phot. **4**, p. 322 (2012)
- [45] Z. Wang, *et al.*, *Jones phase microscopy of transparent and anisotropic samples*, Opt. Lett. **33**, p. 1270 (2008)
- [46] A. Bassi, B. Schmid and J. Huisken, *Optical tomography complements light sheet microscopy for in toto imaging of zebrafish development*, Development **142**, 1016 (2015)
- [47] J. Mayer, *et al.*, *OPTiSPIM: integrating optical projection tomography in light sheet microscopy extends specimen characterization to nonfluorescent contrasts*, Opt. Lett. **39**, p. 1053 (2014)



## ANNEXE : Transformée de Fourier et résolution en microscopie optique

La transformée de Fourier est une extension pour les fonctions non périodiques du développement de Fourier (ou développement en série). Pour une fonction  $f(x)$ , elle s'écrit :

$$\tilde{f}(\xi) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x) e^{-i\xi x} dx$$

Le lecteur intéressé par les propriétés mathématiques de cette transformation trouvera sur la page Wikipedia correspondante ([http://fr.wikipedia.org/wiki/Transformation\\_de\\_Fourier](http://fr.wikipedia.org/wiki/Transformation_de_Fourier)) de plus amples détails, et dans les références [1-3], une description de ses applications à l'optique. La référence [4] présente en détail les aspects numériques de l'optique de Fourier.

Cette transformation a en effet une grande importance en optique, car une lentille effectue en fait une transformée de Fourier entre les dimensions spatiales  $x$ , et les dimensions angulaires, qui sont directement reliées aux composantes de Fourier  $\xi$ , aussi appelée fréquences spatiales, et constituant le spectre de l'objet observé. Ceci permet de comprendre très simplement les grandes caractéristiques du processus de formation des images. Nous en introduisons ici juste l'aspect principal à connaître, permettant de comprendre un des avantages de la microscopie tomographique diffractive, à savoir sa meilleure résolution.

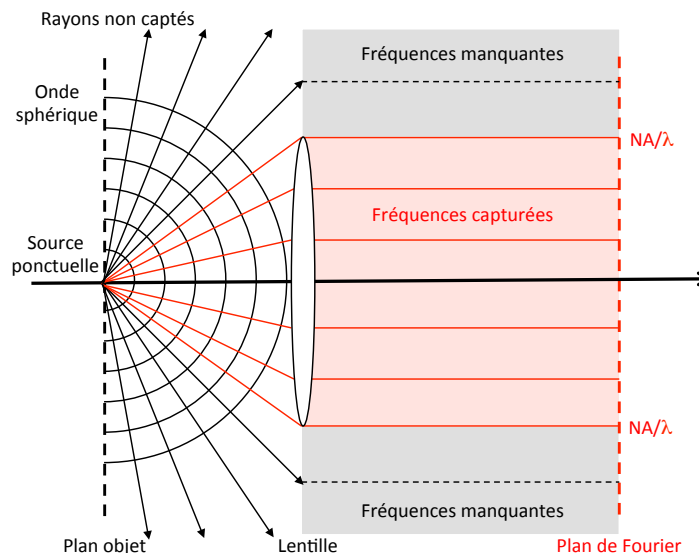


Figure 1 : schéma de principe de la transformation de Fourier optique qu'effectue une lentille.

La figure 1 montre que l'intégralité du rayonnement émis par une structure microscopique, ici, pour raison de simplicité, une source ponctuelle émettant une onde sphérique, ne peut être captée par un objectif de microscope, à cause de son ouverture numérique finie. Il agit donc comme un filtre ne laissant passer que les basses-fréquences dans l'espace de Fourier : on dit que le spectre transmis par le système est le spectre de l'objet, filtré par un filtre passe-bas.

La résolution est donc limitée en fréquences à une fréquence maximale  $NA/\lambda$ .

Pour capter de plus grandes fréquences spatiales, on peut agir sur 3 paramètres :

- augmenter l'ouverture numérique  $NA = n \sin\alpha$ , mais on sera toujours limité au mieux à  $\sin\alpha = 1$ , soit  $\alpha = 90^\circ$  en théorie (en pratique de l'ordre de  $70^\circ$ ).
- augmenter l'ouverture numérique  $NA = n \sin\alpha$ , en observant le spécimen dans un milieu d'indice élevé (objectif à immersion), mais en pratique, on restera limité par les indices des huiles à des valeurs relativement faibles :  $NA=1,4$ ).
- pour un microscope en transmission : incliner les rayons d'illumination (via le condenseur). On montre en effet qu'une rotation de l'illumination du spécimen, correspond à une

translation des fréquences dans l'espace de Fourier. On montre alors que la fréquence spatiale maximale finalement captable par le système optique vaut alors  $NA_{\text{condenseur}}/\lambda + NA_{\text{objectif}}/\lambda$ .

A ce stade, il apparaît que pour un microscope classique, et pour un microscope tomographique diffractif utilisant les mêmes objectifs et condenseur, la fréquence spatiale maximale captable par le système optique est la même. La meilleure résolution du microscope tomographique diffractif est liée à une propriété particulière de la lumière cohérente (éclairage par une onde plane laser) : les fréquences spatiales transmises dans le système optique ne subissent pas d'atténuation, alors que les fréquences spatiales transmises par le système optique lorsqu'on utilise un éclairage de Köhler sont fortement atténuées pour les grandes fréquences.

Ceci est illustré par la figure 2 (en une dimension pour plus de simplicité). Pour une incidence d'illumination parallèle à l'axe optique, le spectre transmis par le système optique est la porte d'ouverture  $[-NA/\lambda, NA/\lambda]$  avec un coefficient de transmission constant de 1.

En imagerie de Köhler, le spectre transmis par le système optique est le triangle en pointillés d'ouverture  $[-2NA/\lambda, 2NA/\lambda]$ , qui montre que les hautes fréquences sont transmises, mais avec un coefficient d'atténuation de plus en plus grand.

En microscopie tomographique diffractive, le spectre transmis par le système optique est maintenant la porte d'ouverture  $[-2NA/\lambda, 2NA/\lambda]$ , avec un coefficient de transmission constant de 1, grâce à l'utilisation d'une illumination en onde plane fournie par un laser.

Lorsqu'on fait la transformée de Fourier de ces spectres, on alors obtient une résolution spatiale, de  $\lambda/2NA$  en microscopie en illumination de Köhler, et  $\lambda/4NA$  en microscopie tomographique diffractive (même si en pratique, cette valeur n'a pas encore été atteinte, voir section 4.2, et références [4,24,25] de l'article).

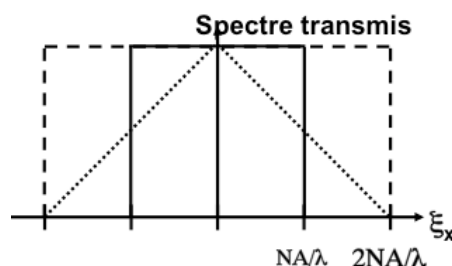


Figure 2 : transmission théorique des fréquences spatiales (en 1D) pour un microscope de phase simple (trait plein), pour un microscope avec éclairage de Köhler (pointillés) et pour un microscope tomographique diffractif (tirets).

Pour le lecteur peu familiarisé avec l'optique de Fourier et les calculs associés, les cours suivants pourront constituer une excellente auto-formation :

Introduction : <http://membres-timc.imag.fr/Yves.Usson/COURS/micro-fourier.pdf>

Niveau avancé : [http://bass2000.obspm.fr/cours/Optique\\_Fourier.pdf](http://bass2000.obspm.fr/cours/Optique_Fourier.pdf)

Niveau avancé : <http://paristech.institutoptique.fr/site.php?id=187&fileid=392>

[1] André Maréchal et Maurice Françon, *Traité d'optique instrumentale. Tome 1-La Formation des images. Tome - Diffraction, structure des images, influence de la cohérence de la lumière*, Éditions de la « Revue d'optique théorique et instrumentale », 1960

[2] Joseph Goodman, *Introduction to Fourier Optics* McGraw-Hill Physical and Quantum Electronics Series, 1968

[3] Joëlle Surré, *Optique instrumentale - Optique de Fourier*, Ellipses, 1996

[4] David G. Voelz, *Computational Fourier Optics: A MATLAB Tutorial (SPIE Tutorial Texts Vol. TT89)*, SPIE Press, 2011